

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**  
**«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ**  
**імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Основи генетичної та клітинної інженерії**

**Частина III. ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР В**  
**БІОТЕХНОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ**

**Методичні вказівки**  
до виконання лабораторних робіт  
для студентів спеціальності  
162 – Біотехнології та біоінженерія

*Рекомендовано вченою радою факультету біотехнології і біотехніки*  
*КПІ імені Ігоря Сікорського*

Київ  
КПІ імені Ігоря Сікорського  
2017

Основи генетичної та клітинної інженерії. Частина III. Застосування клітинних культур в біотехнології і вірусології: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія / Уклад.: Клечак І.Р., Трохименко О.П., Ліновицька В.М., Тітова Л.О. – К.: КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 36 с.

*Гриф надано вченою радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
КПІ імені Ігоря Сікорського  
(протокол № 13 від 26.06.2017 р.)*

Навчальне видання

## **Основи генетичної та клітинної інженерії**

### **Частина III. ЗАСТОСУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР В БІОТЕХНОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ**

#### **Методичні вказівки**

до виконання лабораторних робіт  
для студентів спеціальності  
162 – Біотехнології та біоінженерія

Укладачі: Клечак Інна Ришардівна, к.т.н., доцент  
Трохименко Олена Петрівна, к.б.н., доцент  
Ліновицька Віта Михайлівна, ст.викладач  
Тітова Лариса Олександрівна, к.т.н., ст.викладач

Відповідальний  
редактор Тодосійчук Т.С., д.т.н., доцент

Рецензент Соловйов С. О., к.б.н., доцент

## ВСТУП

На сучасному етапі розвитку наукомістких виробництв методи культури клітин є найбільш поширеними в усіх галузях біотехнології і особливого значення набувають вони у виробництві біологічно активних речовин із живих клітин різного походження для харчової, хімічної, фармацевтичної промисловості, для медицини і ветеринарії, зокрема препаратів для специфічної профілактики і лікування поширених вірусних захворювань людини і тварин.

Перевага використання культур клітин при отриманні таких препаратів полягає у тому, що клітини тварин, на відміну від прокаріотичних (мікробних, генетично модифікованих клітин) здатні здійснювати посттрансляційну модифікацію білків і таким чином синтезувати білки, ідентичні природнім. Більш того, при виробництві інактивованих чи атенуйованих противірусних вакцин, культура клітин є єдиним джерелом одержання біомаси вірусів.

Зважаючи на це, важливою складовою підготовки фахівців-біотехнологів є ознайомлення майбутніх спеціалістів з сучасними технологіями культивування культур клітин та вірусів, а також формування практичних навичок приготування клітинних культур та вірусовмісних біопрепаратів, що є обов'язковими при підготовці фахівців-біотехнологів. Метою методичних вказівок є допомога студентам біотехнологічних з спеціальностей набути навичок роботи з клітинними культурами.

Методичні вказівки містять стисле викладення особливостей приготування перещеплювальних і первиннотрипсинізованих культур клітин тварин і людини, основних методів культивування та титрування вірусів у чутливих клітинних культурах, а також контрольні питання до кожної лабораторної роботи.

При проведенні лабораторного практикуму використовуються методичні розробки [3] та лабораторна база кафедри вірусології НМАПО ім. П.Л. Шупика. В залежності від вимог робочого навчального плану та наявності біологічного матеріалу для проведення лабораторних робіт можливе проведення або всіх зазначених робіт або частини на вибір.

### **ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

1. Для роботи з клітинними культурами та для культивування і титрування вірусів використовують тільки стерильні живильні середовища, сольові розчини, інструменти та матеріали.
2. Скляний посуд, що використовують у роботі, миють та стерилізують у сухожаровій шафі при 180°C впродовж 2 годин або автоклавують при 1,5–2,0 атм впродовж 60 хвилин.
3. Перед початком роботи з клітинними культурами та після її закінчення поверхню столу на робочому місці обробляють 70 % розчином етилового спирту.
4. Пасажування перещеплювальних культур, приготування первиннотрипсинізованої культури клітин фібробластів ембріонів курки (ФЕК) та культивування і титрування вірусів проводять в асептичних умовах (окремих стаціонарних боксах, настільних або ламінарних боксах).
5. Використання спільного боксу для приготування перещеплювальних, первиннотрипсинізованих клітинних культур та роботи з вірусами **категорично забороняється**. Наприкінці кожного тижня бокси миють з дезрозчинами і опромінюють ультрафіолетовими лампами.
6. Після роботи весь забруднений біологічними матеріалами посуд занурюють на 24 години у 3 % розчин хлораміну або 6 % розчин перекису водню. Тільки після хімічної (або термічної) обробки використаний посуд може бути переданий для миття або для подальшої утилізації.

## **ТЕМА: СУЧАСНІ МЕТОДИ ТА ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ**

### ***Короткі теоретичні відомості***

Клітинні системи посідають провідне місце у біотехнологічних і вірусологічних дослідженнях. Це одна з трьох біологічних систем, що застосовуються для культивування вірусів, поряд з лабораторними тваринами та ембріонами птахів. Розрізняють переживаючі і проліферуючі клітинні системи. До переживаючих клітинних систем належать культури органів, до проліферуючих – культури клітин. Існують три типи клітинних культур: первинні (первиннотрипсинізовані), диплоїдні (або клітинні штами) та перещеплювальні клітинні культури (або клітинні лінії). Всі вони мають свої переваги та недоліки.

#### **Перещеплювальні культури клітин (або клітинні лінії)**

Переваги: 1) необмежена кількість пасажувань (потенційне безсмертя); 2) вільні від контамінантів; 3) відносна простота і стандартизація умов культивування. Недоліки: 1) за морфологією суттєво відрізняються від клітин тканини, з якої вони були вперше отримані; 2) вибіркова чутливість до вірусів; 3) не диплоїдний набір хромосом; 4) потенційна онкогенність.

Джерелом одержання клітинних штамів і клітинних ліній є первинні клітинні культури, які набувають властивість необмеженого розмноження в результаті трансформації. Трансформація це сукупність змін, що призводять до появи у клітин первинної культури нових властивостей, в результаті яких з'являються клітинні лінії.

**Клітинні лінії можуть бути одержані:** з тканин людини, трансформованих безпосередньо в організмі (з тканин злоякісних пухлин), наприклад HEP-2 (аденокарциноми гортані), RD (рабдоміосаркоми); з ембріональних тканин людини, наприклад RH, A1-A5, A8 (нирки

ембріона), L-132 (легені ембріона); з ембріональних та соматичних тканини тварин, наприклад L929 – фібробласти ембріона миші, СНЕВ – свиняча нирка ембріональна версенізована, ВНК-21 – нирка сирійського хом'ячка. Перещеплювальні клітинні культури можуть давати початок новим варіантам або сублініям клітин при зміні характеру живильного середовища або режиму культивування. Під впливом різноманітних фізичних або хімічних чинників вони можуть мутувати, утворювати нові форми в результаті гібридизації або хронічної внутрішньоклітинної вірусної інфекції.

Клітинні культури і, зокрема клітинні лінії, відрізняються між собою **за відношенням до субстрату**. Розрізняють **субстратзалежні і субстратнезалежні** клітинні культури. В першому випадку клітини культури можуть розмножуватись виключно після прикріплення і розпластування на поверхні субстрату (скла, полістиролу тощо), вони придатні як для стаціонарного, так і для ролерного культивування. В другому випадку клітини можуть розмножуватись, знаходячись у суспензії. До субстратзалежних клітинних ліній переважно належать культури, які походять з фібробластів або епітеліальних клітин, а субстратнезалежні клітинні лінії здебільшого походять з лімфобластоподібних або лімфобластоїдних клітин (мієломи, лімфоми, лейкоми). Слід відзначити, що клітини деяких ліній можуть бути адаптовані як до субстрат-залежного, так і до субстрат-незалежного культивування. В біотехнології набули поширення також методи псевдосуспензійного культивування. В цьому випадку клітини прикріплюються і утворюють клітинний моношар на поверхні латексних часток, які культивуються у суспензії.

**Живильні середовища.** Для культивування клітин використовують спеціальні стерильні живильні середовища, сольові розчини, детергенти, розчини ферментів, сироватки крові, антибіотики. Всі процедури, пов'язані з культивуванням, проводять в стерильних умовах. Для культивування клітин використовують природні і синтетичні живильні середовища. При виготовленні *природних живильних середовищ* використовують екстракти тканин, продукти гідролізу молока (гідролізат лактоальбуміну), гемогідролізати. Такі середовища частіше застосовуються для приготування первиннотрипсинізованих клітинних культур. Умови культивування клітин в таких живильних середовищах подібні тим, у яких перебувають клітини в організмі. Проте суттєвим недоліком природних живильних середовищ є неможливість створення контрольованих умов культивування, що пов'язано з варіюючою кількістю компонентів, які входять до їх складу. *Синтетичні живильні середовища* мають сталий хімічний склад і можуть бути одержані при додаванні до збалансованих сольових розчинів визначеної кількості амінокислот, вітамінів, гормонів, біологічно активних речовин. Найбільш вживаними є синтетичні живильні середовища Ігла, Ігла-МЕМ, ДМЕМ, 199, RPMI-1640.

За своїм призначенням живильні середовища поділяються на **ростові і підтримуючі**. Ростові живильні середовища містять біологічні фактори росту. Крім того, обов'язковими компонентами їх є гормони: інсулін, гідрокортизон, кортикостероїди; фактори прикріплення і розпластування (колаген, фібронектин), ліпіди, мінеральні речовини, іони Cu, Zn, Co, V, Se.

Як основні фактори росту ростові живильні середовища містять від 2,5 до 20 % сироватки крові тварин, найчастіше великої рогатої худоби, новонароджених телят або ембріонів корів. Підтримуючі живильні середовища можуть бути без додавання сироватки або містити її до 2,5 %.

**Допоміжні розчини.** При культивуванні клітинних культур для приготування живильних середовищ та промивання клітин і тканин широко застосовують збалансовані сольові розчини, наприклад розчини Хенкса і Ерла.

Для зняття клітин із поверхні росту використовують 0,02 % розчин Версена. Розчин протеолітичного ферменту трипсину 0,25 % необхідний для виготовлення первиннотрипсинізованих клітинних культур, для зняття клітин з поверхні росту, для культивування деяких вірусів. Розчин натрію гідрокарбонату 7,5 % використовують для приготування живильних середовищ і розчинів, коректування їх рН.

**Антибіотики.** Досягнення позитивного результату при культивуванні культур клітин не можливо без додержання асептичних умов роботи. Для запобігання росту пліснявих грибів і бактерій використовують антибіотики. Зазвичай обмежуються застосуванням пеніциліну і стрептоміцину в кінцевих концентраціях 100 Од/мл, які пригнічують ріст грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Проте, часто застосовують антибіотики широкого спектру дії, зокрема гентаміцин, лінкоміцин, ністатин у кінцевих концентраціях, які не токсичні для культур клітин, але достатні для пригнічення росту патогенних мікроорганізмів.

Клітини культивують здебільшого у скляних або полістиролових спеціальних посудинах (культуральних матрасах) різного об'єму, у скляних полістиролових флаконах, пробірках та у стерильних полістиролових планшетах одноразового використання. Для дозування рідин використовують мірні флакони, стерильні скляні піпетки, автоматичні дозатори різного об'єму.



## **Лабораторна робота 1. Приготування перещеплювальних культур клітин людини і тварин**

**Мета роботи** – одержання та послідовне пасажування перещеплювальних стабільних клітинних ліній людини і тварин.

Перещеплювальні культури клітин людини і тварин культивують у вигляді клітинного моношару, вкритого рідким живильним середовищем, на внутрішній поверхні пляшок із прозорого незабарвленого нейтрального скла різної ємкості, а також у пробірках, полістиролових матрасах та у полістиролових планшетах для культури клітин.

Пасажування клітинних культур проводять в асептичних умовах у стаціонарних, настільних або ламінарних боксах із застосуванням стерильних живильних середовищ і сольових розчинів.

Процедура культивування перещеплювальних культур клітин складається з таких послідовно виконуваних етапів:

1. Підготовка живильних середовищ та необхідних розчинів.
2. Макроскопічний візуальний контроль якості культури клітин.
3. Мікроскопічний контроль якості клітинного моношару.
4. Зняття клітин із поверхні субстрату (скла, полістиролу).
5. Приготування суспензії клітин визначеної посівної концентрації у ростовому живильному середовищі.
6. Внесення суспензії клітин у культуральні флакони або мікропланшети.
7. Культивування культури клітин на поверхні субстрату.

**Матеріали:** живильні середовища для культур клітин: 199, ДМЕМ, Ігла-МЕМ, RPMI-1640 та інші; сироватка крові ембріонів корів; сироватка крові великої рогатої худоби (перед застосуванням її обов'язково прогрівають впродовж 40 хвилин при 56°C з метою інактивації неспецифічних білків); розчин Версену 0,02 %; антибіотики; спирт

етиловий 96 %; водний розчин спирту етилового 70 %; 3 % розчин хлораміну.

**Обладнання:** стаціонарні бокси, настільні бокси, ламінарний бокс; апарат для інактивації сироватки; термостат; камера Горяєва; спиртовий пальник; пінцети анатомічні; ножиці; олівці для маркування; вата; ємкість для зливу відпрацьованого живильного середовища та розчинів; ємкість для сухих відходів; ємкість для спирту; гумова груша з трубкою; стерильні піпетки різного об'єму; флакони для приготування ростового середовища; стерильні пробки для флаконів, матрасів і пробірок (№ 24 і № 14,5); стерильні флакони, матраси, планшети для культивування клітин; сірники або запальничка; ємкість із дезрозчином (3 % розчином хлораміну) для дезінфекції відпрацьованих піпеток; ємкість із 3 % розчином хлораміну для дезінфекції відпрацьованого посуду, пробок.

## **Хід роботи**

### **1. Підготовка живильних середовищ та необхідних розчинів**

#### **1.1 Відкривання стерильних флаконів, матрасів, пляшок та інших ємкостей**

Пляшки, флакони, матраси з культурою клітин, живильними середовищами і сольовими розчинами відкривають у стерильній зоні навколо полум'я пальника діаметром до 20 см. Перед відкриванням будь-якої ємкості з культурою клітин, живильними або сольовими розчинами, її горловину, пробку і місце з'єднання пробки і горловини протирають тампоном, змоченим 96 % етиловим спиртом і пропалюють над вогнем.

#### **1.2 Приготування розчину антибіотиків**

Відкривають флакони з ліофілізованими антибіотиками, наприклад пеніциліном та стрептоміцином. Вміст кожного флакона розчиняють у

живильному середовищі так, щоб його кінцева концентрація у готовому розчині становила 100 000 од/мл для пеніциліну і 100 000 мкг/мл для стрептоміцину. По 1 мл кожного з одержаних розчинів вносять в пробірки Еппендорфа, заморожують і зберігають до моменту використання.

### 1.3 Приготування ростового живильного середовища

Ростовим вважається живильне середовище, що містить більш ніж 2,5 % сироватки і в якому клітини культури здатні прикріплюватись до субстрату, розпластуватись і розмножуватись з утворенням суцільного клітинного моношару. Здебільшого для його приготування використовують суміші відомих живильних середовищ у різних співвідношеннях (в залежності від паспортних характеристик клітинної культури).

Для приготування ростового живильного середовища, флакони з вихідними живильними середовищами (наприклад ДМЕМ і 199) відкривають. В кожний флакон, в розрахунку на 500 мл середовища, вносять по 1 мл розчинів антибіотиків до кінцевої концентрації їх 100 од/мл для пеніциліну і 100 мкг/мл для стрептоміцину, вміст перемішують.

У разі використання середовища Ігла без глютаміну, у 500 мл його додатково розчиняють 150 мг L-глютаміну, що додається в комплекті до середовища.

Живильні середовища змішують у рівних співвідношеннях і розливають у стерильні флакони. До отриманої суміші середовищ додають сироватку ембріонів корів (ЕТС) до кінцевої концентрації 5 % (на кожні 95 мл суміші середовищ додають 5 мл ЕТС).

У разі необхідності застосування живильного середовища, що містить сироватку великої рогатої худоби (ВРХ), її додають до суміші

середовищ до кінцевої концентрації 10 % (на кожні 90 мл суміші середовищ додають 10 мл сироватки ВРХ).

Флакони з готовим ростовим живильним середовищем закривають пробками, маркують і зберігають в холодильнику при +4°C.

Перед застосуванням для культивування перещеплювальних клітинних культур флакони з середовищем витримують в термостаті при 37°C впродовж 40 хвилин.

## **2. Макроскопічне дослідження культури клітин**

Перед проведенням пасажування обов'язковим є макро- і мікроскопічне дослідження культури клітин.

Макроскопічне дослідження клітинної культури проводять при яскравому зовнішньому освітленні. Візуально визначають колір ростового живильного середовища, його мутність, наявність сторонніх часток. Ростове живильне середовище повинно бути рожевого, оранжевого або оранжево-жовтого кольору. Якщо живильне середовище має яскраво жовтий або малиновий колір, клітинна культура вважається непридатною для подальшого пасажування.

Ростове живильне середовище повинно бути прозорим та вільним від сторонніх часток. У випадку помутніння та наявності таких часток, клітинна культура вважається непридатною для подальшого пасажування.

## **3. Мікроскопічне дослідження культури клітин**

Мікроскопічне дослідження клітинного моношару проводять при невеликому збільшенні під світловим мікроскопом (наприклад, МБС-9) або під інвертованим мікроскопом. При мікроскопічному дослідженні клітинного моношару звертають увагу на його якість. Клітинний моношар повинен складатись з однакових за морфологією і розмірами прозорих клітин, бути цілісним, рівномірним, без осередків дегенерації клітин.

У випадку виявлення у клітинному моношарі різних за морфологією клітин, порушенні цілісності моношару або при появі осередків дегенерації клітин, – культура вважається непридатною для подальшого пасажування.

#### **4. Зняття клітин із субстрату**

Придатну для пасажування моношарову культуру клітин знімають із скла 0,02 % розчином Версену (з цією метою можна також використовувати 0,25 % розчин трипсину або суміш розчинів Версену і трипсину у співвідношенні 1:1).

Видаляють ростове живильне середовище (РС). Клітинний моношар промивають від залишків РС невеликою кількістю розчину Версену, відразу виливаючи його із культурального флакона.

У культуральний флакон вносять розчин Версену, потім його щільно закривають і витримують в термостаті при 37°C впродовж 5–20 хвилин (в залежності від виду клітинної культури). При цьому клітини повинні знаходитись під розчином Версену.

Ступінь відторгнення клітин від субстрату контролюють візуально та при мікроскопічному дослідженні. В останньому випадку клітини набувають форми кульок і розміщуються окремо одна від одної.

Розчин Версену видаляють з культурального флакону, зливаючи його по стінці, протилежній тій, де розміщується клітинний моношар. При цьому у культуральному флаконі (в залежності від його об'єму), можна залишати від 0,2 до 2 мл розчину Версену. В ньому готують суспензію клітин, інтенсивно піпетуючи її піпеткою з тонко відтягнутим кінцем з метою одержання найбільшої кількості окремих клітин та попередження утворення клітинних конгломератів. До суспензії клітин додають 10 мл ростового живильного середовища та інтенсивно перемішують.

## **5. Приготування суспензії клітин заданої посівної концентрації**

Для визначення концентрації клітин в приготованій суспензії із загальної кількості отриманих клітин відбирають 0,2 мл і вміщують в окрему пробірку (або пеніциліновий флакон). В цю ж пробірку вносять 0,8 мл 0,5 % розчину мортального барвника трипанового синього та перемішують. При цьому кінцеве розведення суспензії становить 1:5.

Одержану суспензію вносять у камеру Горяєва і підраховують під мікроскопом кількість живих (незабарвлених) клітин у 25 великих квадратах камери.

Кількість клітин у 1 мл суспензії підраховують за формулою:

$$N = n \cdot a \cdot 10^4,$$

де N – загальна кількість клітин в 1 мл суспензії; n – кількість клітин у 25 великих квадратах; a – розведення (в даному випадку 5); 10000 – коефіцієнт перерахунку.

**Приклад:** розраховано, що у 25 великих квадратах камери Горяєва міститься 72 клітини. Звідси:  $N = 72 \cdot 5 \cdot 10^4 = 360 \cdot 10^4 = 3,6 \cdot 10^6$  кл/мл.

Після цього із вихідної клітинної суспензії готують суспензію клітин заданої посівної концентрації.

## **6. Культивування перещеплювальних культур клітин**

Приготовану суспензію вносять у культуральні флакони з ростовим середовищем і маркують. На флаконі з культурою обов'язково вказують: дату пасажування, вид культури, порядковий номер пасажу, коефіцієнт пересівання або посівну концентрацію клітин, склад РС. Клітини культивують при 37°C 24–96 годин до утворення суцільного клітинного моношару.

## **7. Пасажування перещеплювальних культур клітин з урахуванням коефіцієнту пересівання**

При періодичному пасажуванні культур клітин з метою їх підтримання, дозволяється пасажування з урахуванням коефіцієнту пересівання, який визначають для кожної культури індивідуально.

### **Варіант 1**

Пасажування клітинних культур за коефіцієнтом пересівання (наприклад, 1:4).

1. Готують суспензію клітин за п. 4.
2. До одержаної суспензії додають РС в об'ємі, що в 4 рази перевищує об'єм РС у флаконі при попередньому пасажі культури.
3. Одержану суспензію вносять порівну у 4 культуральні флакони, флакони маркують, клітини культивують при 37°C впродовж 24–96 годин до утворення суцільного клітинного моношару.

### **Варіант 2**

1. Готують суспензію клітин за п. 4.
2. Половину об'єму цієї суспензії відкидають, а решту суспендують в РС в об'ємі, що в 2 рази перевищує об'єм РС у флаконі при попередньому пасажуванні культури.
3. Одержану суспензію клітин в РС ретельно перемішують, розділяють порівну на 2 культуральні флакони і культивують при 37°C впродовж 24–96 годин до утворення суцільного клітинного моношару.

При пасажуванні перещеплювальних клітинних культур, з метою запобігання їх втрати, обов'язковим є одержання не менш ніж двох флаконів з культурою наступного пасажу.

Після закінчення роботи всі відпрацьовані флакони обов'язково занурюють у ємкість з дезрозчином.

## **КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

- 1.** Назвіть джерела походження перещеплювальних стабільних клітинних ліній.
- 2.** Які характерні ознаки мають перещеплювальні стабільні клітинні лінії?
- 3.** Наведіть приклади найбільш широко застосовуваних в біотехнології стабільних клітинних ліній та розкажіть про їх походження.
- 4.** Які основні чинники впливають на ріст клітин у культурі?
- 5.** Як розподіляються клітинні культури за ознакою відношення до субстрату?
- 6.** Які переваги мають перещеплювальні культури клітин в порівнянні з первиннотрипсинізованими клітинними культурами?
- 7.** Вкажіть основні недоліки перещеплювальної культури клітин.
- 8.** Які основні живильні середовища використовуються в біотехнології культур клітин тварин?
- 9.** Які сольові розчини використовуються при роботі з культурами клітин *in vitro*?
- 10.** Назвіть фази росту культур клітин. Яка з них є найбільш сприятливою для наступного пасажування культури?
- 11.** Які основні чинники впливають на швидкість формування клітинного моношару?
- 12.** Що є джерелом факторів росту при культивуванні клітин тварин?
- 13.** Дайте визначення посівної концентрації клітин. Як вона впливає на швидкість досягнення культурою логарифмічної фази росту?
- 14.** Які ознаки вказують на необхідність заміни живильного середовища при культивуванні клітинних культур?
- 15.** Якими способами можна продовжити перебування клітин в культурі в логарифмічній фазі росту?



## **Лабораторна робота 2. Приготування первинотрипсинізованої культури клітин фібробластів ембріону курки**

### ***Короткі теоретичні відомості***

**Первинні (первинотрипсинізовані) клітинні культури** одержують із тканин людини або тварини шляхом їх ферментативного дезінтегрування методом холодної або теплової трипсинізації.

Переваги: 1) за морфологічною будовою не відрізняються від клітин тканини, з якої вони одержані; 2) мають диплоїдний набір хромосом; 3) чутливі до багатьох вірусів; 4) безпечні в онкогенному відношенні; 5) можуть бути одержані у великій кількості.

Недоліки: 1) трудомісткість і тривалість процедури одержання; 2) обмежена кількість пасажувань (до 10); 3) можливість контамінації бактеріями і вірусами як під час приготування, так і при вірогідному інфікуванні організму, з якого взята тканина.

**Диплоїдні клітинні культури (або клітинні штами)** займають проміжне положення між первинними та перещеплювальними культурами. Це морфологічно однорідна популяція клітин, стабілізована у процесі культивування *in vitro*, яка має обмежений термін життя і характеризується трьома фазами (стабілізації, активного росту, старіння).

Переваги: 1) за морфологічною будовою подібні до клітин тканини, з якої вони одержані; 2) чутливі до багатьох вірусів; 3) вільні від контамінантів; 4) мають диплоїдний набір хромосом; 5) безпечні в онкогенному відношенні.

Недоліки: 1) обмежена кількість пасажувань (до 100); 2) виняткова вибагливість до умов культивування.

Диплоїдні клітинні культури використовують у діагностиці вірусних інфекцій та у виробництві вакцин.

**Мета роботи** – одержання первиннотрипсинізованої культури клітин фібробластів ембріону курки (ФЕК).

Процедура приготування первиннотрипсинізованої культури клітин ФЕК складається з таких послідовно виконуваних етапів:

1. Підготовка живильних середовищ та необхідних розчинів.
2. Макроскопічний контроль придатності яйця для приготування культури клітин фібробластів овоскопуванням курячих ембріонів (КЕ).
3. Розтин КЕ і видалення тіла ембріона.
4. Видалення голови і внутрішніх органів ембріона.
5. Відмивання шкірно-м'язового препарату КЕ сольовим розчином.
6. Механічне подрібнення тканин шкірно-м'язового препарату КЕ.
7. Теплова трипсинізація тканин КЕ.
8. Фільтрування суспензії клітин ФЕК.
9. Осадження клітин ФЕК центрифугуванням.
10. Приготування суспензії клітин ФЕК із заданою посівною концентрацією у ростовому живильному середовищі.
11. Культивування клітин ФЕК.

**Матеріали:** 9–10-денні курячі ембріони, живильні середовища для культур клітин (199, ДМЕМ); розчин Хенкса; сироватка крові ембріонів корів (СКЕК); сироватка крові великої рогатої худоби (перед застосуванням її обов'язково прогрівають впродовж 40 хвилин при 56°C з метою інактивації неспецифічних білків); розчин трипсину 0,25 %; антибіотики; спирт етиловий 96 %; водний розчин спирту етилового 70 %; 3 % розчин хлораміну; 0,5 % водно-спиртовий розчин трипанового синього.

**Обладнання:** настільні бокси; апарат для інактивації сироватки (АІС); центрифуга ОПН-3–1; термостат; овоскоп; магнітна мішалка; гемоцитометр (камера Горяєва); спиртовий пальник; пінцети анатомічні;

ножиці; олівці для маркування; вата; ємкість для зливу відпрацьованого живильного середовища та розчинів; ємкість для сухих відходів; ємкість для спирту; гумова груша з трубкою; стерильні піпетки різного об'єму; стерильні флакони ємністю 0,5 л для приготування живильних середовищ; стерильні пробки для флаконів, матрасів і пробірок (№ 24 і № 14,5); стерильний флакон, стерильна лійка та марлевий фільтр для фільтрування клітин; стерильні центрифужні пробірки; стерильні флакони, матраси, планшети для культивування клітин; сірники або запальничка; ємкість з дезрозчином (3 % розчином хлораміну) для дезінфекції відпрацьованих піпеток; ємкість з 3 % розчином хлораміну для дезінфекції відпрацьованого посуду, пробок.

### **Хід роботи**

Всі роботи з приготування живильних середовищ, розчинів та безпосередньо приготування первиннотрипсинізованої культури клітин ФЕК проводяться в асептичних умовах.

#### **1. Підготовка живильних середовищ та необхідних розчинів**

Приготування розчинів антибіотиків та ростового поживного середовища проводиться так само, як в лабораторній роботі 1, п. 1. Флакони з готовим ростовим живильним середовищем закривають пробками, маркують і зберігають в холодильнику при +4°C. Перед застосуванням для культивування первиннотрипсинізованих клітинних культур, сироватку інактивують прогріванням з метою звільнення її від неспецифічних протеїнів – інгібіторів росту клітин. Прогрівання проводять в апараті для інактивації сироваток при 56°C впродовж 40 хвилин.

#### **2. Макроскопічний контроль придатності курячих ембріонів**

Для приготування первиннотрипсинізованої культури ФЕК

найчастіше використовують курячі ембріони (КЕ) на 9–10 - й добі розвитку.

Макроскопічний контроль КЕ на придатність для приготування культури клітин фібробластів проводять шляхом овоскопування. Під час овоскопування визначають життєздатність КЕ. Ознаки живого ембріона – наявність самостійних рухів, добре виражений судинний малюнок, пульсація судин. Також під час овоскопування визначають і позначають на шкаралупі межі повітряної камери, місце розташування ембріона (“темне око” ембріона).

### **3. Розтин КЕ і видалення тіла ембріона**

Яйце розташовують на підставці тупим кінцем до верху. Шкаралупу яйця протирають 96 % етиловим спиртом і пропалюють факелом.

Ножицями з гострими кінцями проколюють шкаралупу вище лінії, яка позначає межі повітряної камери, зрізують і видаляють шкаралупу в межах повітряної камери. Після цього ножиці і пінцет занурюють у 70 % розчин етанолу і пропалюють над вогнем. Аналогічним способом інструменти обробляють після виконання кожного окремого фрагменту роботи.

Видаляють підшкаралупну оболонку ембріона. Пінцетом захоплюють тіло КЕ і переносять у стерильну чашку Петрі.

### **4. Видалення голови і внутрішніх органів ембріона**

Голову ембріона відсікають ножицями. Вздовж тулуба ембріона, з боку спинки, роблять подовжній розріз, через який видаляють нутрощі.

Одержаний шкірно-м'язовий препарат КЕ переносять у стерильну чашку Петрі.

### **5. Відмивання шкірно-м'язового препарату КЕ**

Шкірно-м'язовий препарат КЕ двічі промивають розчином Хенкса з метою видалення решток яєчного білку та домішок крові. Відмитий шкірно-м'язовий препарат КЕ переносять у іншу стерильну чашку Петрі.

## **6. Механічне подрібнення шкірно-м'язового препарату КЕ**

Шкірно-м'язовий препарат КЕ ретельно подрібнюють ножицями.

## **7. Теплова трипсинізація тканин КЕ**

У чашку Петрі із подрібненими шматочками тканини КЕ поступово вносять 0,25% розчин трипсину, попередньо підігрітий до 37°C. Для трипсинізації одного КЕ використовують 20 мл цього розчину.

Подрібнену тканину шкірно-м'язового препарату КЕ піпетують у розчині трипсину.

Вміст чашки піпеткою переносять у стерильний флакон або стерильну конічну колбу.

Аналогічно одержані препарати від кількох КЕ об'єднують у одному флаконі, який вміщують на магнітну мішалку.

Теплову трипсинізацію продовжують ще 30–40 хвилин при 37°C.

## **8. Фільтрування суспензії клітин ФЕК**

Перед початком фільтрування до одержаної зависі клітин додають рівний об'єм підтримуючого середовища (без сироватки) і ретельно перемішують.

Одержану після трипсинізації розведену в 2 рази завись дрібних шматочків тканин та окремих клітин КЕ фільтрують у стерильний культуральний флакон через 2 шари стерильної марлі.

## **9. Осадження клітин ФЕК**

Фільтрат розливають у стерильні центрифужні пробірки.

Клітини ФЕК відділяють з фільтрату центрифугуванням при 1,5 тис. об/хв на центрифугі ОПН-3.

Після закінчення центрифугування надосадкову рідину обережно зливають, а клітини ФЕК ресуспендують у підтримуючому середовищі, додаючи його по 1 мл у кожную пробірку.

Одержану суспензію клітин ФЕК у підтримуючому середовищі (наприклад 10 мл суспензії) об'єднують у окремому стерильному флаконі, в який вносять додатково 40 мл ростового живильного середовища з 10 % сироватки крові великої рогатої худоби (ВРХ) або 5% сироватки ембріонів корів (СКЕК), а потім додатково іще відповідно 1 мл ВРХ або 0,5 мл СКЕК.

Одержану суспензію клітин ФЕК у ростовому живильному середовищі ретельно перемішують.

#### **10. Приготування суспензії клітин ФЕК із заданою посівною концентрацією**

Для визначення концентрації клітин в приготованій суспензії із флакона, що містить приготовану суспензію клітин ФЕК відбирають 0,1 мл цієї суспензії і вмішують у пеніциліновий флакон (або пробірку), з 0,9 мл 0,5% розчину мортального фарбника трипанового синього, тим самим розводячи вихідну суспензію клітин у 10 разів.

Флакон з загальною масою клітин ФЕК зберігають у холодильнику при +4°C з метою попередження передчасного прикріплення клітин до скла.

З одержаного 1 мл суспензії 0,2 мл вносять в камеру Горяєва і підраховують під мікроскопом кількість живих (незабарвлених) клітин у 25 великих квадратах камери. Кількість клітин у 1 мл суспензії підраховують за формулою:

$$N = n \cdot a \cdot 10^4,$$

де N – загальна кількість клітин в 1 мл суспензії; n – кількість клітин у 25 великих квадратах; a – розведення (в даному випадку 10); 10000 – коефіцієнт перерахунку.

**Приклад:** розраховано, що у 25 великих квадратах камери Горяєва міститься 72 клітини. Звідси:  $N = 72 \cdot 10 \cdot 10^4 = 720 \cdot 10^4 = 7,2 \cdot 10^6$  кл/мл.

Із вихідної клітинної суспензії готують суспензію клітин заданої посівної концентрації.

**Приклад:** Необхідна посівна концентрація –  $1 \cdot 10^6$  кл/мл. Для її отримання вихідну суспензію клітин ФЕК розводять в 7,2 рази ( $7,2 \cdot 10^6 / 1 \cdot 10^6 = 7,2$ ), тобто, до кожного 1 мл суспензії клітин додають 6,5 мл ростового живильного середовища. Відповідно, до 50 мл готової суспензії клітин додають 310 мл ростового живильного середовища.

### **11. Культивування клітин ФЕК**

Приготовану суспензію клітин ФЕК вносять в культуральні флакони, пеніцилінові флакончики, пробірки або мікропланшети і відповідно маркують. На флаконі з культурою обов'язково вказують: дату пасажування, вид культури, коефіцієнт пересівання, посівну концентрацію клітин, склад РС.

Клітини культивують при 37°C 24–96 годин до утворення суцільного клітинного моношару.

## **КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

- 1.** Які типи живильних середовищ використовуються в біотехнології культур клітин тварин? Дайте їм характеристику, наведіть приклади.
- 2.** Які допоміжні розчини використовуються при культивуванні клітин *in vitro*, їх склад та призначення?
- 3.** Назвіть джерела одержання первиннотрипсинізованих клітинних культур.
- 4.** Які характерні властивості мають первиннотрипсинізовані клітинні культури?

5. Які переваги мають первиннотрипсинізовані клітинні культури у порівнянні з перещеплюваними культурами клітин?
6. Які умови сприяють розмноженню клітин у культурі?
7. Що є джерелом факторів росту при культивуванні первиннотрипсинізованих культур тварин?
8. Яким живильним середовищем надають перевагу при приготуванні первиннотрипсинізованих клітинних культур?
9. Які методи трипсинізації використовуються для одержання первиннотрипсинізованих клітинних культур, назвіть їх основні відмінності?
10. З яких основних етапів складається процедура приготування первиннотрипсинізованої культури клітин фібробластів ембріону курки (ФЕК)?
11. Перерахуйте основні типи внутрішньолaborаторних аварій і назвіть дії персоналу щодо запобігання інфікуванню?

## **ТЕМА: КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ ТВАРИН У КЛІТИННИХ СИСТЕМАХ**

### ***Короткі теоретичні відомості***

Віруси є внутрішньоклітинними паразитами і можуть розмножуватись (репродукуватись) тільки у живих системах, однією з яких є клітинні культури. Унікальні особливості вірусів обумовлені наявністю одного типу нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), відсутністю власного білоксинтезуючого апарату та диз'юнктивним способом розмноження.



Морфологічні зміни, що виникають при взаємодії вірусів і клітин, називають *цитопатичною дією (ЦПД)*, а віруси, які стають причиною таких змін називають *цитопатогенними*. Репродукція вірусів в клітинах відбувається в декілька стадій: адсорбція вірусів на поверхні клітин, прикріплення вірусів до специфічних мембранних рецепторів, проникнення вірусів у клітину і звільнення вірусної нуклеїнової кислоти від білкового капсиду („роздягання” вірусу) – це ранні етапи репродукції вірусів. Пізні етапи репродукції включають: реплікацію вірусного геному згідно з його стратегією, транскрипцію, трансляцію вірусспецифічних білків, збирання вірусних часток і їх вихід у міжклітинний простір. Період репродукції і характер цитопатичних змін, спричинених цитопатогенними вірусами в інфікованих культурах клітин, визначаються: властивостями вірусу, інфікуючою дозою вірусу, властивостями клітин та умовами їх культивування. Характерні для кожного вірусу цитопатичні зміни розвиваються в культурах клітин, заражених середніми дозами вірусу (100 – 1000 інфекційних доз). Кількісно одна інфекційна доза вірусу відповідає найбільшому розведенню вірусомісного матеріалу, при зараженні яким цитопатична дія спостерігається в половині заражених клітинних моношарів і виражається як  $TCD_{50}$ /одиницю об’єму, наприклад у 1 мл.

J. Enders в 1954 році запропонував класифікувати цитопатогенні віруси на 3 групи: 1) ті, що спричиняють лише дегенерацію клітин; 2) ті, що зумовлюють утворення внутрішньоклітинних (цитоплазматичних і ядерних) включень; 3) ті, що формують багатоядерні клітини-симпласти, які утворюються при злитті клітинних мембран під впливом вірусних білків.

### **Лабораторна робота 3. Культивування та титрування вірусів в клітинних культурах**

**Мета роботи** – культивування вірусів в клітинних культурах людини і тварин та їх титрування макро- і мікрометодами.

Процедура культивування вірусів у клітинних культурах складається з таких послідовно виконуваних етапів:

1. Макроскопічний контроль якості культур клітин у пробірках (або пеніцилінових флакончиках) та мікропланшетах.
2. Мікроскопічний контроль якості клітинних моношарів.
3. Формування дослідних і контрольних груп з флакончиків із клітинними моношарами та їх відповідне маркування; маркування мікропланшетів.
4. Відмивання клітинних моношарів сольовим розчином Хенкса.
5. Приготування десятикратних серійних розведень вірусу у підтримуючому середовищі.
6. Нанесення вірусвмісної рідини на клітинні моношари.
7. Культивування вірусу.
8. Облік результатів:

Мікроскопічне дослідження клітинних моношарів і визначення:

- характеру цитопатичної дії вірусу;
- інфекційного титру вірусу за методом Кербера;
- 1, 10 і 100 цитопатичних доз вірусу;
- інфекційної активності вірусу.

**Матеріали:** моношарові перещеплювальні культури клітин (карциноми гортані людини (HEP-2), фібробласти ембріону миші (L-929), свинячої нирки ембріональної версенізованої (CHEB) або інші) у пеніцилінових флакончиках; віруси (наприклад, вірус везикулярного

стоматиту (BBC)); підтримуюче живильне середовище з антибіотиками; розчин Хенкса; спирт етиловий 96 та 70%

**Обладнання:** мікроскоп світловий; мікроскоп інвертований; термостат; штативи для пробірок; штативи для флаконів; стерильний скляний посуд (флакони на 500, 100 і 50 мл); стерильні пробірки; стерильні пеніцилінові флакончики середні; стерильні піпетки на 2, 5 та 10 мл; дозатори одноканальні та багатоканальні; стерильні наконечники для мікропіпеток.

### **Хід роботи**

#### **1. Макроскопічний контроль якості культур клітин**

Для культивування та титрування вірусів використовують 24–48 годинні клітинні моношари.

При макроскопічному контролі відбирають пробірки (флакончики) з клітинними моношарами, колір ростового середовища в яких оранжево-жовтий, що відповідає рН 7,0–7,2. Пробірки з середовищем яскраво-жовтого або малинового кольору вибраковуюють.

При макроскопічному контролі клітинних моношарів у мікропланшеті діють аналогічно.

#### **2. Мікроскопічний контроль якості клітинних моношарів**

Проводять мікроскопічне дослідження клітинних моношарів при малому збільшенні.

Придатними для титрування вірусів вважають такі пробірки, в яких клітинні моношари рівномірно сформовані, клітини прозорі, прилягають одна до одної і за морфологічною будовою відповідають паспортним характеристикам культури.

Пробірки, в яких клітинні моношари не повністю сформовані (спостерігається острівцевий ріст клітин, є вогнища дегенерації або

наявність великої кількості атипових клітин) вибраковуюють. Те саме стосується і клітинних моношарів у лунках мікропланшету.

### **3. Формування дослідних і контрольних груп з клітинних моношарів та їх маркування**

Після макро- і мікроскопічного контролю клітинних моношарів з пробірок (флакончиків) формують дослідну і контрольну групи. На кожне розведення вірусу використовують по 2 пробірки.

На кожну пробірку наносять маркування, що вказує на відповідне розведення вірусу. Маркують 2 пробірки, які будять контролем (не інфіковані вірусом). Для титрування вірусу від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$  потрібно 16 пробірок з клітинними моношарами.

При титруванні у мікропланшетах на кожне розведення вірусу використовують по 4 лунки і по 4 лунки залишають для контролю клітин. На одному 96-лунковому планшеті від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$  можна протитрувати 3 зразки вірусу.

### **4. Відмивання клітинних моношарів сольовим розчином Хенкса**

Клітинні моношари у кожній пробірці відмивають розчином Хенкса. При цьому ростове середовище видаляють із всіх флакончиків (виливають). У кожний флакончик (включаючи і контрольний) вносять по 1 мл розчину Хенкса, обережно споліскують моношар, і використаний розчин знову видаляють. У флакончики повторно вносять по 1 мл розчину Хенкса, закривають і залишають для відмивання при кімнатній температурі так, щоб внесений розчин повністю покривав клітинні моношари.

3 мікропланшетів ростове живильне середовище видаляють, витрушуючи його над кристалізатором.

У всі лунки мікропланшета вносять по 100 мкл розчину Хенкса, після чого планшет залишають при кімнатній температурі для відмивання клітинних моношарів.

### **5. Приготування десятикратних серійних розведень вірусу**

Готують послідовні десятикратні розведення вірусу у підтримуючому середовищі від  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ . Для цього у 7 стерильних пробірок вносять по 4,5 мл підтримуючого живильного середовища (без сироватки).

В першу пробірку вносять 0,5 мл вірусомісної рідини, що підлягає титруванню. Використавши піпетку знімають і занурюють у дезрозчин. Чистою піпеткою вміст першої пробірки перемішують і 0,5 мл середовища з неї переносять у другу пробірку. Використавши піпетку знімають і занурюють у дезрозчин. Тобто, після перенесення вірусомісної рідини із попередньої пробірки в наступну, *кожен раз піпетку заміняють на нову*.

### **6. Нанесення вірусомісної рідини на клітинні моношари**

Розчин Хенкса із *флакончиків* з клітинними моношарами видаляють.

Чистою піпеткою, *починаючи із найбільшого розведення*, вірусомісну рідину вносять у відповідні пробірки (флакончики). При цьому користуються *однією піпеткою*.

У флакончики з моношарами для контролю клітин вносять по 1 мл підтримуючого середовища. Флакончики закривають, ретельно перевіряючи герметичність.

При титруванні вірусу у *мікропланшетах*, розчин Хенкса, що використовувався для відмивання клітинних моношарів видаляють. В кожну лунку мікропланшета вносять по 100 мкл підтримуючого живильного середовища. В першу лунку мікропланшета мікропіпеткою вносять 10 мкл вірусомісної рідини, що підлягає титруванню. Вміст лунки перемішують, і не змінюючи наконечника, 10 мкл рідини з неї

переносять у другу лунку. Виконують послідовні десятиразові розведення не міняючи наконечника піпетки. Тільки після виконання останнього розведення наконечник замінюють на новий. Аналогічно титрують вірус в другій – четвертій паралельних пробах.

Лунки для контролю клітин залишають заповненими підтримуючим живильним середовищем.

### **7. Культивування вірусу**

У флакончиках вірус культивують при 37°C впродовж 24–48 годин, а у мікропланшетах – при 37°C впродовж 24–48 годин у атмосфері 5 % CO<sub>2</sub>.

### **8. Облік результатів**

Облік результатів проводять через 24–48 годин від моменту інфікування вірусом клітинних моношарів.

Спочатку досліджують контрольні клітинні моношари. В них не повинно бути проявів цитопатичної дії вірусу. Дослідження клітинних моношарів в дослідних флакончиках або лунках мікропланшета починають з найменшого розведення. В паралельних пробах визначають характер цитопатичної дії вірусу (ЦПД), та кількість тест-об'єктів, в яких виявляється цитопатичний ефект вірусу (ЦПЕ). Наявність ЦПЕ позначають знаком (+), відсутність ЦПЕ – знаком (–).

### **9. Розрахунок інфекційного титру вірусу за методом Кербера**

Результати досліджень оформлюють у вигляді табл. 1, в яку заносять розведення вірусу, дані про наявність чи відсутність цитопатичного ефекту вірусу, % тест-об'єктів з ЦПЕ, пропорції тест-об'єктів.

В контролі клітин – нормальний ріст (ЦПЕ відсутній).

Таблиця 1. Визначення інфекційного титру вірусу за методом Кербера

Розведення вірусу	Результат дослідження	Пропорція	% тест-об'єктів з ЦПЕ	Пропорції тест-об'єктів
$10^{-1}$	++++	4/4	100	1
$10^{-2}$	++++	4/4	100	1
$10^{-3}$	++++	4/4	100	1
$10^{-4}$	++--	2/4	50	0,5
$10^{-5}$	----	0/4	0	0
$10^{-6}$	----	0/4	0	0
$10^{-7}$	----	0/4	0	0
Контроль клітин	----	0/4	0	0

Примітка: (+) ЦПЕ спостерігається; (–) ЦПЕ відсутній.

Розрахунок інфекційного титру вірусу за методом Кербера проводять за формулою:

$$\lg \text{ТЦД}_{50} = L - d (S - 0,5),$$

де  $L$  – логарифм початкового розведення в досліді;  $d$  – різниця між логарифмами послідовних розведень;  $S$  – сума пропорцій тест-об'єктів, що дали позитивний результат (тобто ЦПЕ).

В наведеному прикладі:  $\lg \text{ТЦД}_{50} = -1 - 1 (3,5 - 0,5) = -4,0$ .

**Інфекційний титр вірусу (титр вірусу)** у вірусовмісній рідині це те її найбільше розведення, при якому в половині тест-об'єктів спостерігається позитивний результат (тобто ЦПЕ). В розглянутому випадку титр вірусу дорівнює  $10^{-4,0}$   $\text{ТЦД}_{50}$  у визначеному об'ємі.

**Одна інфекційна доза вірусу** завжди дорівнює титру вірусу.

Відповідно 10 і 100 інфекційним дозам вірусу відповідає розведення вірусовмісної рідини до  $10^{-3}$  та  $10^{-2}$ .

**Інфекційна активність вірусу** відповідає оберненому значенню його титру і, в даному випадку, визначається як  $10^{4,0}$  тканинних цитопатичних доз вірусу (ТЦД<sub>50</sub>) у визначеному об'ємі – 1 мл або 0,1 мл (при титруванні мікрометодом) і позначається відповідно як  $10^{4,0}$ ТЦД<sub>50</sub>/мл або  $10^{4,0}$ ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл.

### **КОНТРОЛЬНІ ПИТАННЯ**

- 1.** Як класифікують віруси за ступенем їх патогенності?
- 2.** Які віруси входять в групу особливо небезпечних збудників інфекції?
- 3.** Назвіть категорії вірусологічних лабораторій.
- 4.** Основні причини внутрішньолaboratorного зараження співробітників лабораторії.
- 5.** В чому полягають особливості організації вірусологічної лабораторії?
- 6.** Який принцип покладено в основу ділення лабораторних приміщень на зони?
- 7.** Основні правила роботи у базових вірусологічних лабораторіях.
- 8.** Які приміщення входять до складу базової вірусологічної лабораторії?
- 9.** Як необхідно проводити підготовку до роботи робочого місця вірусолога у базовій вірусологічній лабораторії?
- 10.** Які засоби індивідуального захисту застосовуються у базовій вірусологічній лабораторії?
- 11.** Основні дезінфікуючі розчини, які використовуються у вірусологічній лабораторії.
- 12.** Який лабораторний посуд використовують у сучасній вірусологічній лабораторії?
- 13.** Які біологічні системи використовуються в біотехнології для культивування вірусів?



- 14.** Назвіть ранні і пізні етапи репродукції вірусів в культурі клітин.
- 15.** Який клінічний матеріал може бути використаний для виділення вірусів?
- 16.** Перерахуйте основні етапи підготовки клінічного матеріалу для виділення вірусів.
- 17.** Назвіть основні способи деконтамінації клінічного матеріалу перед його внесенням у клітини.
- 18.** Як визначити, чи придатні клітинні культури для культивування вірусів?
- 19.** Які основні етапи підготовки клітинних моношарів до інфікування вірусами?
- 20.** Назвіть ознаки, за наявності яких клітинні моношари не можуть бути використані для інфікування вірусами.
- 21.** Відзначте особливості культивування і титрування вірусів макро- і мікрометодами.
- 22.** Що таке інфекційна активність вірусу, як вона визначається, її зв'язок з інфекційним титром вірусу?
- 23.** Як розрахувати за формулою Кербера інфекційний титр вірусу?
- 24.** Як визначають інфекційний титр вірусів у культурі клітин за методом Кербера?

## РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Голубев А.Д., Соминина А.А., Медведева М.Н. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. – Ленинград : Медицина, 1976. – 223 с.
2. Культура животных клеток. Методы / Под ред. Р.Фрешни – М. : Мир, 1989. – 332 с.
3. Посібник з медичної вірусології / За ред. Гиріна В.М. – К. : Здоров'я, 1995. – 368 с.
4. Практикум із загальної вірусології / За ред. Бойка А.Л. – К.: Київський університет, 2000. – С.103–120.
5. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита / ВООЗ, Женева-Москва, 1998. – 113 с.

## ЗМІСТ

ВСТУП	3
ЗАСТЕРЕЖЕННЯ	4
ТЕМА: СУЧАСНІ МЕТОДИ ТА ОСОБЛИВОСТІ КУЛЬТИВУВАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН ТВАРИН І ЛЮДИНИ	5
Лабораторна робота 1. Приготування перещеплювальних культур клітин тварин і людини	9
Лабораторна робота 2. Приготування первиннотрипсинізованої культури клітин фібробластів ембріону курки	17
ТЕМА: КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ ТВАРИН У КЛІТИННИХ СИСТЕМАХ	24
Лабораторна робота 3. Культивування та титрування вірусів в клітинних культурах	26
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	34